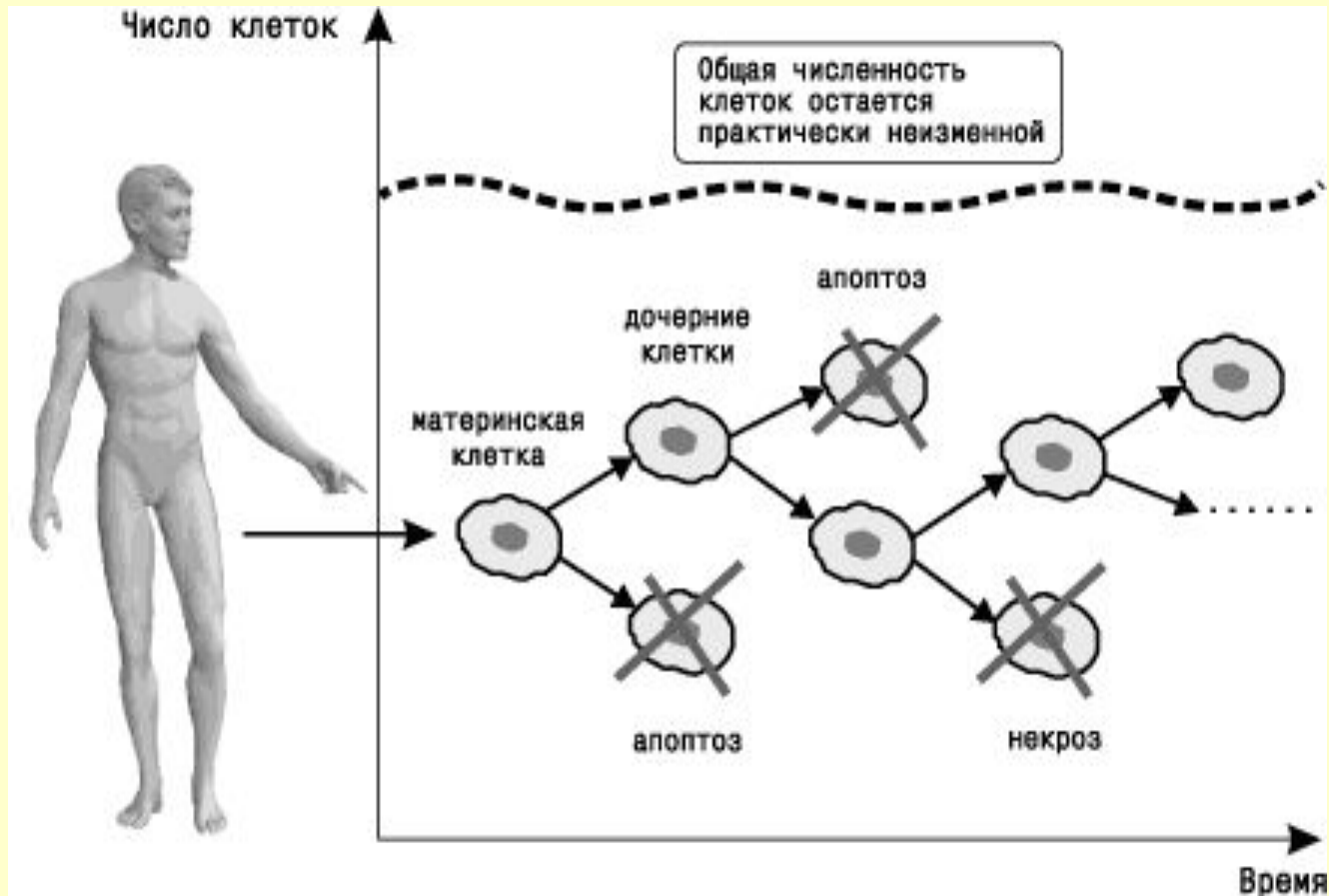


МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ



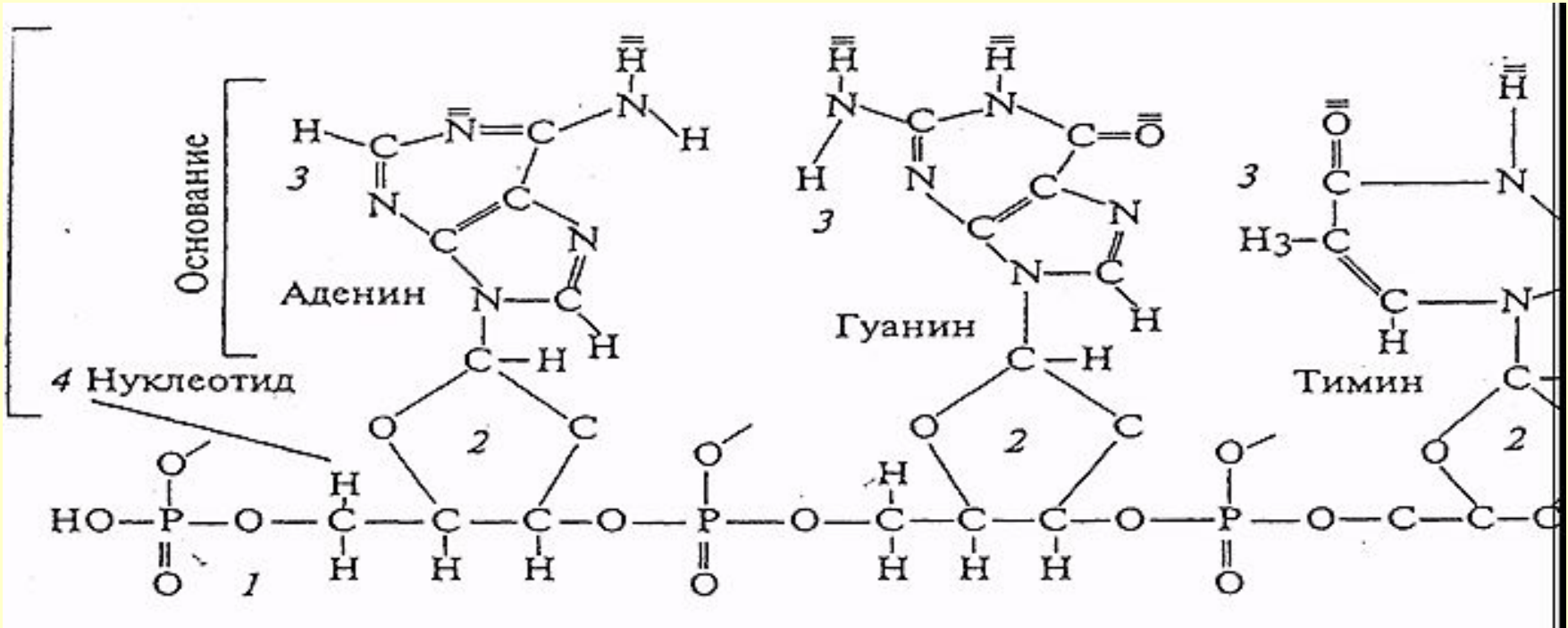
Радиационные повреждения ДНК

- При облучении клетки поражаются все ее структуры.
- Вероятность поражения тех или иных молекул определяется их размером: чем крупнее молекула, тем, естественно, больше вероятность ее повреждения.
- Именно поэтому в качестве основной мишени радиационного поражения клетки рассматривается ДНК.
- Общая длина всех молекул ДНК в клетке человека составляет около 2 м.
- ДНК распределена по 46 хромосомам, в каждой хромосоме имеется только одна молекула ДНК (до ее репликации при подготовке клетки к делению), длина которой, в зависимости от размера хромосомы, варьирует от 1,7 до 8,5 мкм.
- Гены, кодирующие тот или иной белок, находятся только в двух хромосомах, одна из которых унаследована от отца, а другая — от матери.
- Ген, наличие которого определяет мужской пол ребенка, представлен в клетке в единичной копии в Y-хромосоме.

Радиационные повреждения ДНК

- Основной молекулы ДНК являются две нити (также называемых цепями, или цепочками), построенные из повторяющихся участков (звеньев), образуемых дезоксирибозой (относящейся в химическом плане к сахарам) и фосфорной кислотой, которые, в свою очередь, соединены между собой эфирными связями.
- Эта часть ДНК называется ее сахаро-фосфатным скелетом (или остовом молекулы). К каждому кольцу дезоксирибозы присоединено одно из четырех оснований — пуриновых (аденин или гуанин) или пиримидиновых (тимин или цитозин). Основание вместе с дезоксирибозой образует нуклеозид. (см. слайд 4).
- Строительными элементами ДНК являются нуклеотиды — нуклеозиды, у которых дезоксирибоза соединена с остатком фосфорной кислоты (фосфорилированные нуклеозиды). Каждое из оснований имеет две или три водородные связи с одним из оснований противоположной нити ДНК (аденин — с тимином, гуанин — с цитозином). Одна из нитей определяет генетическую информацию клетки и с нее считывается информация по расположению аминокислот в белках, а вторая служит для точного воспроизведения этой нити в процессе удвоения ДНК при подготовке клетки к делению.

Строение одной из двух нитей ДНК



- 1- сахаро-фосфатный скелет; 2- дезоксирибоза;
3- азотистые основания аденин, гуанин, тимин; 4 - нуклеотид

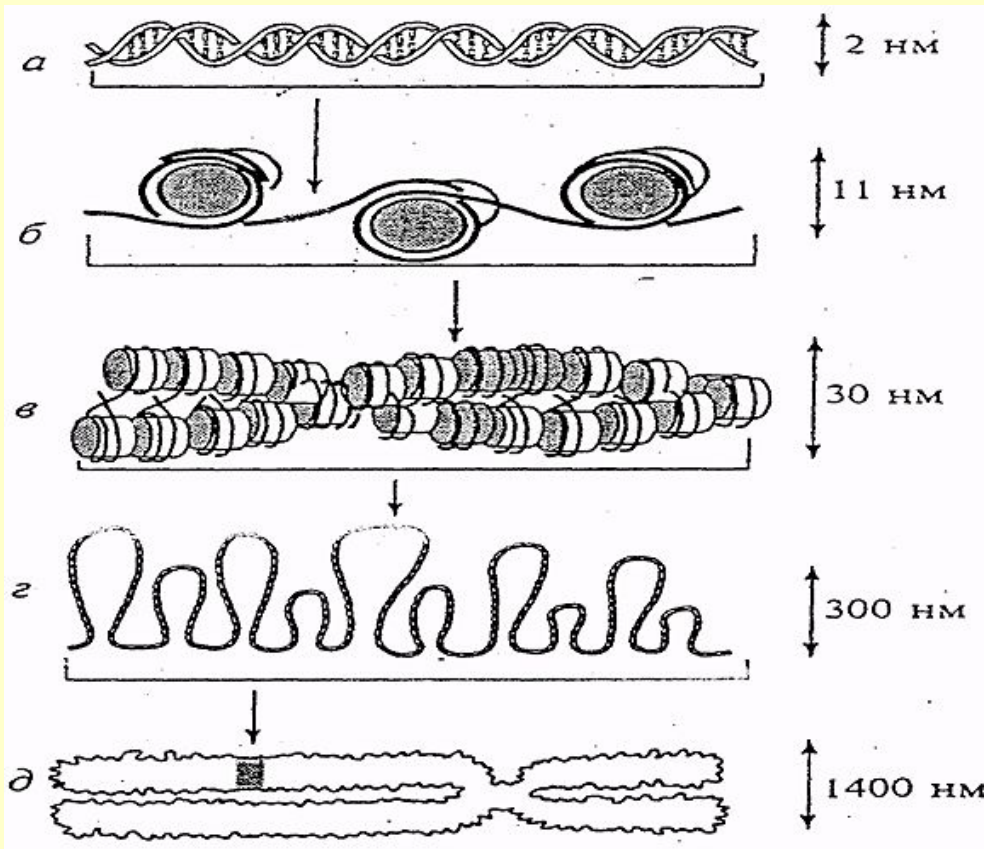
Радиационные повреждения ДНК

- В клетке различные участки ДНК одной и той же молекулы находятся очень близко друг к другу из-за многократного сворачивания ДНК в структуры все большего и большего диаметра. См. рис 1, слайд 8). Двойная спираль ДНК имеет диаметр 1,7 нм (эта величина часто для простоты принимается равной 2 нм), расстояние между витками спирали равно 3,4 нм (см. рис.1, а). Участки нити ДНК длиной около 200 пар нуклеотидов периодически сворачиваются вокруг структур, образованных белками основного характера — гистонами, формируя нуклесомы диаметром 11 нм (рис.1,б). ДНК, связанную с белком, называют хроматином, а всю структуру — «бусинками (нуклеосомы) на нитке».
- Нуклеосомная нить в свою очередь складывается в структуры диаметром 30 нм (рис. 1.в), образующие так называемые гигантские петли общей длиной 300 тыс. пар оснований. Эти петли строго фиксируются внутри ядра, прикрепляясь белковым «якорем» к ядерной мембране и фибриллярной сети ядерного матрикса. Каждая гигантская петля хроматина в нескольких точках прикрепляется к молекуле топоизомеразы II, создавая структуру, называемую розеткой, лепестки которой образуются нитью ДНК длиной 50 тыс. пар оснований.

Радиационные повреждения ДНК

- Следующие уровни упаковки хроматина — петли шириной 300 нм, из которых формируются петли шириной 700 нм, располагающиеся поперек хроматиды (см. рис. 1,з). Хромосома в метафазе состоит из двух хроматид, одна из которых образована «родительской», а вторая — синтезированной в S-периоде новой нитью ДНК (см. рис. 1,д). Хроматиды соединены между собой центромерой (Ц), образуя хромосому. В анафазе хроматиды отделяются друг от друга и расходятся к полюсам деления клетки. В этот момент бывшие хроматиды начинают называться хромосомами дочерних клеток.
- Плотность упаковки отдельных участков ДНК постоянно меняется, что связано с синтезом на ней РНК в момент считывания информации для синтеза белков, а также с репликацией (удвоением) ДНК при подготовке клетки к делению.
- С позиций радиобиологии важен факт теснейшего пространственного расположения различных частей одной и той же молекулы ДНК в интерфазной клетке и в хромосоме (см. рис. 1, з) и, кроме того, близкое расположение молекул ДНК, принадлежащих разным хромосомам.

Строение участка молекулы ДНК и ее пространственная упаковка в интерфазном ядре и (после конденсации) в хромосоме делящейся клетки



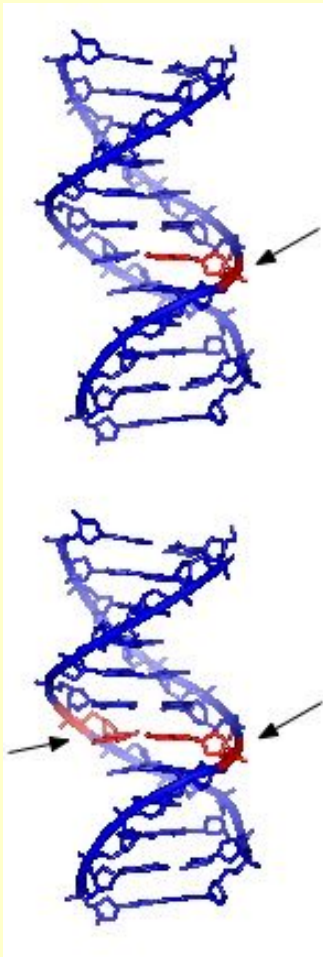
а – Двойная спираль ДНК;

б – молекула ДНК, свернутая в нуклеосомы;

в - нуклеосомная нить;

г, д - следующие уровни хроматина

Радиационные повреждения ДНК

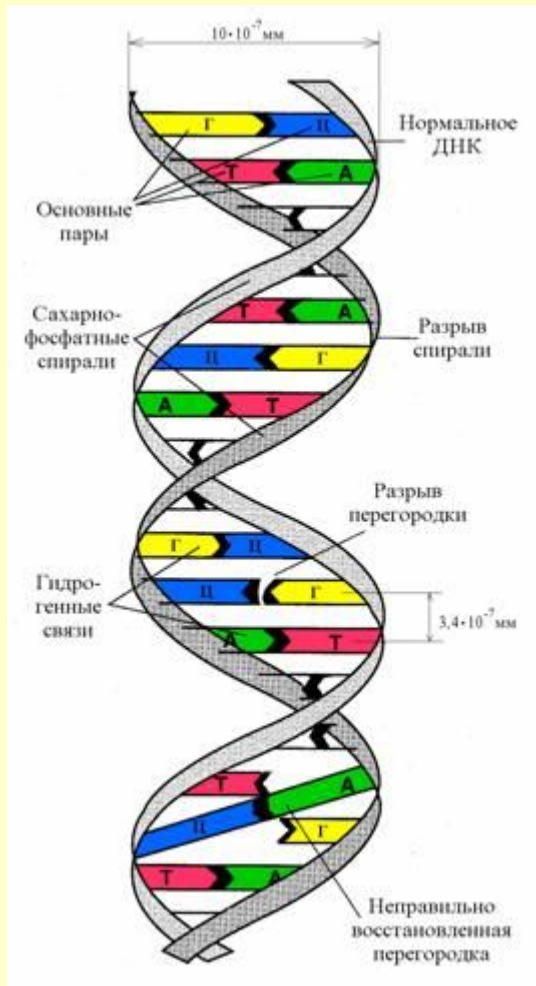


- **Однонитевое и двунитевое повреждения ДНК**
- В результате прямой ионизации самой молекулы ДНК и ее атаки радикалами OH^* происходит разрыв химических связей между атомами.
- Разрыв связей в сахаро-фосфатном скелете нарушает непрерывность нити ДНК.
- Если разорвана одна из нитей, говорят об однонитевом или одиночном разрыве.
- Совпадение разрывов противоположных нитей ДНК в одной точке приводит к появлению двойных (двунитевых) разрывов.

Радиационные повреждения ДНК

- Известно, что одиночные разрывы постоянно возникают в клетке и без всякой связи с облучением, просто вследствие тепловой нестабильности ДНК, а также в результате некоторых окислительных и ферментативных процессов. Более того, одиночные разрывы даже необходимы: при репликации ДНК молекула должна быть расплетена на участке синтеза, для чего одна нить должна иметь возможность вращаться относительно другой, чего невозможно достичь без ее разрыва.
- Предполагается, однако, что при облучении возникают не только одиночные разрывы, аналогичные возникающим спонтанно, но еще появляются «комплексные», при которых в скелете ДНК рядом находится сразу несколько разорванных связей; такие разрывы репарируются хуже, чем возникающие в нормальных условиях.
- Двойные разрывы образуются как при случайном пространственном совпадении одиночных разрывов в противоположных нитях ДНК так и вследствие одномоментного повреждения обеих нитей при выделении в данном микрообъеме клетки большого количества энергии.

Радиационные повреждения ДНК



- Разрыв межатомных связей в сахаро-фосфатном скелете ведет к нарушению непрерывности молекулы ДНК, что препятствует:
- считыванию с нее генетической информации (если разрыв приходится на транскрибируемый участок генома),
- нормальной репликации ДНК и последующему распределению генетического материала между клетками.
- Поврежденные основания и нуклеотиды подвергаются дальнейшим химическим изменениям.

Механизм индукции и реализации смерти клетки (апоптоза)

- **Еще одним следствием повреждения молекул ДНК является включение процесса программируемой клеточной смерти — апоптоза.**
- **Многие виды клеток после облучения погибают как по апоптотическому, так и по некротическому пути, но ряд клеток, прежде всего лимфоидного происхождения, погибает в основном путем апоптоза.**
- **Клетки лимфоидного происхождения значительно более радиочувствительны, чем клетки любого другого происхождения.**
- **Их более ранняя гибель и высокая радиочувствительность объясняются запуском механизма программируемой смерти при таком уровне поражения ДНК, который сам по себе приводит клетку к гибели с гораздо меньшей вероятностью.**
- **Апоптотическая смерть клетки в принципе является нормальным для организма процессом, участвующим в онтогенезе, дифференцировке, реакции на генотоксические внешние воздействия.**
- **Апоптотическая смерть — один из наиболее важных способов сохранения организмом своего гомеостаза, роль которого особенно велика в противодействии злокачественному перерождению.**

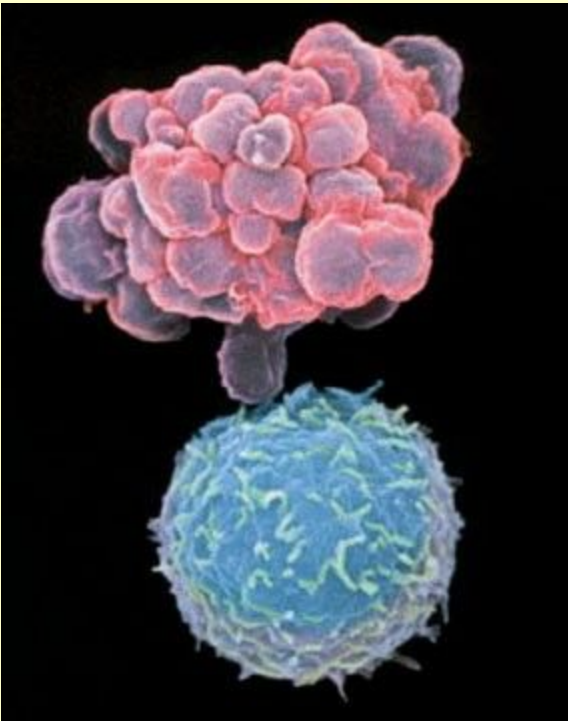
Механизм индукции и реализации смерти клетки (апоптоза)

- Именно путем апоптоза происходит удаление трансформированных клеток. В клетке существует механизм выявления нарушений в структуре ДНК, сопряженный с выдачей сигнала на систему ее разрушения.
- На молекулярном уровне выделяют три стадии апоптоза — стадию выявления нарушений в структуре клеточных компонентов и индукции сигнала к апоптотической смерти, стадию «принятия решения» и стадию «исполнения приговора». Сигналом к индукции апоптоза служит либо повреждение ДНК (обнаруживаемое с участием белка p53), либо повреждение митохондриальных мембран, ведущее к выходу из митохондрий в цитоплазму цитохрома С.
- При апоптозе ДНК распадается на строго определенные фрагменты, при некрозе — на участки различной длины.
- При некрозе ядерная и клеточная мембраны разрушаются на самых ранних этапах гибели, при апоптозе даже апоптотические тела окружены мембранами.
- Внутриклеточные органеллы сохраняются и видны в апоптотических телах, при некрозе они полностью разрушаются.

Механизм индукции и реализации смерти клетки (апоптоза)

- Очень четко развитие апоптоза проявляется при наблюдении за клетками, окрашенными двумя флуоресцентными красителями ДНК, один из которых всегда легко проникает через клеточную мембрану (краситель, имеющий синюю флуоресценцию), а второй доходит до ДНК только после нарушения целостности клеточной оболочки (пропидий йодид, флуоресцирующий в красной области спектра).
- **До начала апоптоза ядро имеет равномерную синюю окраску, указывающую на равномерное распределение ДНК по его объему;**
- с началом апоптотического процесса наблюдается конденсация ядерного материала в синие глыбки хроматина, цвет которых затем меняется с синего на розовый вследствие нарушения целостности мембраны и поступления в клетку йодида пропидия. Изменение цвета сопровождается возрастанием общей флуоресценции глыбок из-за присоединения к ДНК сразу обоих красителей.
- Далее происходит распад клетки на апоптотические тельца, в которых видна яркая флуоресценция ДНК.

АПОПТОЗ

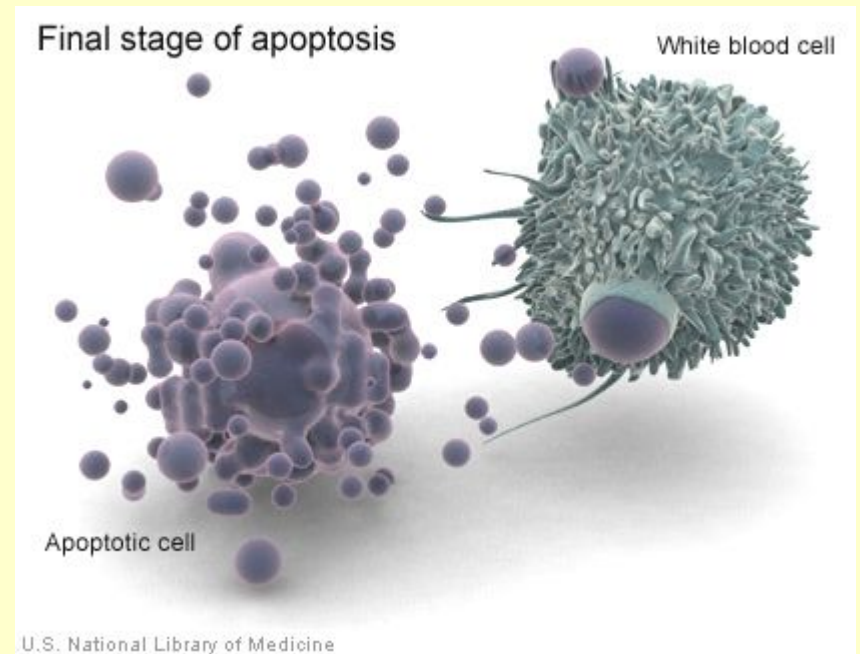


- До начала апоптоза ядро имеет равномерную синюю окраску, указывающую на равномерное распределение ДНК по его объему;
- с началом апоптотического процесса наблюдается конденсация ядерного материала в синие глыбки хроматина, цвет которых затем меняется с синего на розовый вследствие нарушения целостности мембраны и поступления в клетку йодида пропидия.
- Изменение цвета сопровождается возрастанием общей флюоресценции глыбок из-за присоединения к ДНК сразу обоих красителей. Далее происходит распад клетки на апоптотические тельца, в которых видна яркая флюоресценция ДНК.

АПОПТОЗ



Финальная стадия апоптоза



Механизм индукции и реализации смерти клетки (апоптоза)

- Клетки могут значительно различаться по времени гибели после облучения.
- Лимфоциты периферической крови, а также некоторые (но не все) клетки лимфоидного происхождения погибают в первые часы после облучения, не доходя до деления.
- **Большинство других клеток погибает в течение нескольких дней после облучения, при этом некоторые из них проходят несколько делений, так что погибают «внуки», «правнуки» и т.д. облученной клетки.**
- **Сейчас уже ясно, что гибель клеток практически всегда происходит в интерфазе, но не только перед первым постлучевым делением, но в интерфазе после второго и последующих делений.**
- При этом клетки погибают в интерфазе как по апоптотическому, так и по некротическому пути.
- Гибели клеток предшествуют различные изменения в их поведении, одним из которых является появление гигантских клеток.
- Различают два пути образования гигантских клеток — увеличением массы неделивающейся клетки, в том числе происходящем при делении ядер без деления самой клетки, но чаще путем слияния потомков только что разделившейся клетки.

Последовательность ультраструктурных изменений при апоптозе (справа) и некрозе (слева)



- 1 – нормальная клетка;

АПОПТОЗ

- 2 – начало апоптоза;
- 3 – фрагментация апоптотической клетки;
- 4 – фагоцитоз апоптотических телец окружающими клетками;

НЕКРОЗ

- 5 – гибель внутриклеточных структур при некрозе;
- 6 – разрушение клеточной мембраны.

Морфологические проявления апоптоза

- Для клетки, подвергающейся апоптозу характерно:
- **Сжатие клетки.** Клетка уменьшается в размерах; цитоплазма уплотняется; органеллы, которые выглядят относительно нормальными, располагаются более компактно.
- **Конденсация хроматина.** Это наиболее характерное проявление апоптоза. Хроматин конденсируется по периферии, под мембраной ядра, при этом образуются четко очерченные плотные массы различной формы и размеров. Ядро же может разрываться на два или несколько фрагментов.
- Механизм конденсации хроматина изучен достаточно хорошо. Он обусловлен расщеплением ядерной ДНК в местах, связывающих отдельные нуклеосомы, что приводит к развитию большого количества фрагментов, в которых число пар оснований делится на 180-200
- **Формирование в цитоплазме полостей и апоптотических телец.** В апоптотической клетке первоначально формируются глубокие впячивания поверхности с образованием полостей, что приводит к фрагментации клетки и формированию окруженных мембраной апоптотических телец, состоящих из цитоплазмы и плотно расположенных органелл, с или без фрагментов ядра.

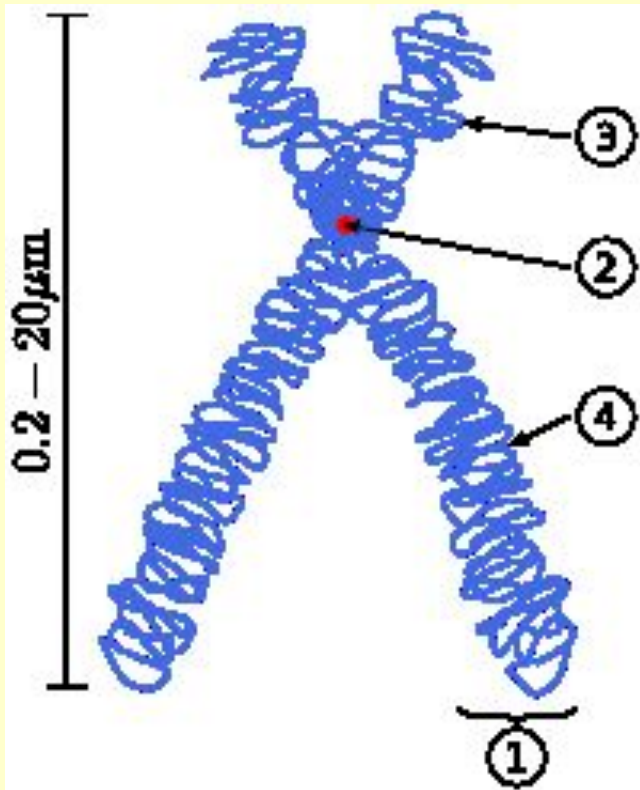
Морфологические проявления апоптоза

- **Фагоцитоз апоптотических клеток или телец** осуществляется окружающими здоровыми клетками, или паренхиматозными, или макрофагами.
- Апоптотические тельца быстро разрушаются в лизосомах, а окружающие клетки либо мигрируют, либо делятся, чтобы заполнить освободившееся после гибели клетки пространство.
- Фагоцитоз апоптотических телец макрофагами или другими клетками активируется рецепторами на этих клетках: они захватывают и поглощают апоптотические клетки.
- ИТАК, апоптоз, или запрограммированная смерть клетки, представляет собой процесс, посредством которого внутренние или внешние факторы, активируя генетическую программу, приводят к гибели клетки и ее эффективному удалению из ткани.
- Морфологически апоптоз проявляется гибелью единичных, беспорядочно расположенных клеток, что сопровождается формированием округлых, окруженных мембраной телец (“апоптотические тельца”), которые тут же фагоцитируются окружающими клетками.

Хромосомные aberrации

- Хромосомные aberrации (перестройки) являются классическим проявлением лучевого поражения клеток.
- Появление aberrаций отражает образование разрывов молекулы ДНК и дефекты ее репарации.
- Разрывы приводят к фрагментации хромосомы. Под фрагментом понимают ту часть хромосомы, которая не связана с центромерой.
- Центромера — это структура, расположенная в середине хромосомы, за которую она притягивается к полюсу деления, иными словами, — к месту, где будет формироваться ядро будущей дочерней клетки.
- Фрагмент хромосомы, не связанный с центромерой, не притягивается к полюсу деления и распределяется между дочерними клетками случайным образом.
- Фрагменты хорошо видны во время метафазы и особенно анафазы, когда все хромосомы притянуты нитями веретена к полюсам деления, а фрагменты остаются посередине клетки. После завершения деления клетки, т. е. в интерфазе, фрагменты проявляются как микроядра — участки конденсированной ДНК, в то время как почти вся остальная ДНК переходит в деконденсированное состояние.

Схема строения хромосомы в поздней профазе — метафазе митоза

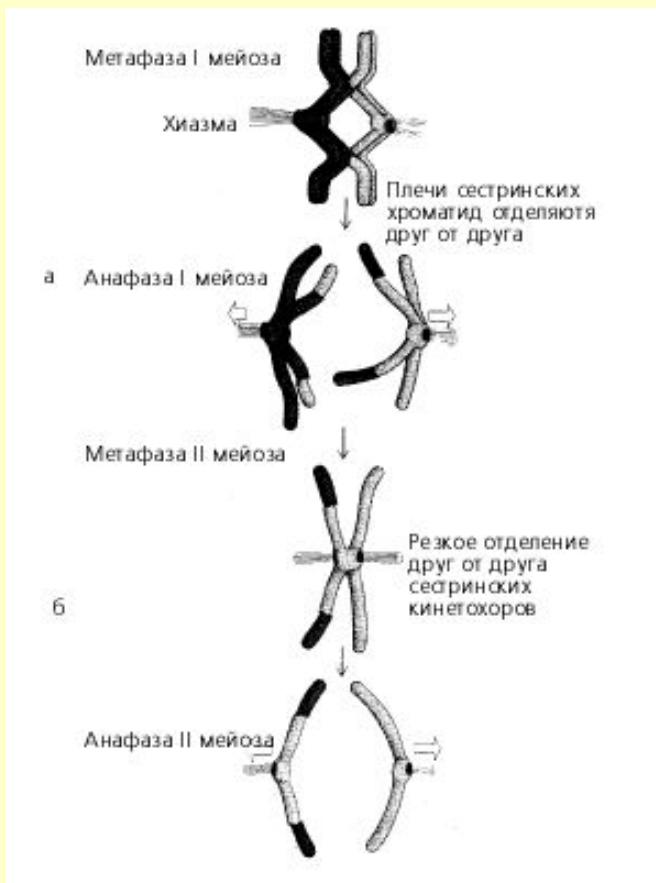


- 1—хроматида;
 - 2—центромера;
 - 3—короткое плечо;
 - 4—длинное плечо.
-
- Отклонения от нормального функционирования центромеры ведут к проблемам во взаимном расположении хромосом в делящемся ядре, и в результате — к нарушениям процесса сегрегации хромосом (распределения их между дочерними клетками).
 - Эти нарушения приводят к анеуплоидии, которая может иметь тяжелые последствия (например, синдром Дауна у человека, связанный с анеуплоидией (трисомией) по 21-й хромосоме).

Хромосомные aberrации

- Неверное воссоединение разрывов, когда при репарации происходит соединение участков ДНК из разных мест одной и той же хромосомы или разных хромосом, во время митоза проявляется в виде хромосомных перестроек.
- Аберрации изучают в клетках, находящихся в метафазе или анафазе, когда все интактные хромосомы расходятся по полюсам клетки, а в центре остаются фрагменты и связанные между собой хромосомы («мосты»), которые должны были бы разойтись по дочерним клеткам.
- Заметим, что в метафазе каждая хромосома выглядит как буква Х, в анафазе — как «галочка» (>).
- Левая и правая часть буквы Х (при вертикальном расположении ее длинной оси) называются хроматидами, а после их расхождения в анафазе — хромосомами.
- Каждая хромосома в анафазе состоит из двух плеч, называемых, из-за обычно разной длины, коротким и длинным плечом. В месте соединения плеч — в вершине «галочки», или центре хромосомы, состоящей из двух хроматид, располагается центромера (называемая кинетическим тельцем хромосомы).

Механизм упорядоченного расположения хромосом в метафазе и их расхождение в анафазе при первом (а) и втором (б) делениях мейоза



- При переходе клетки от метафазы к анафазе центромера делится пополам и половинки расходятся по полюсам деления, разделяя хромосому (X) на две части, что обеспечивает равное распределение генетической информации каждой хромосомы между дочерними клетками.
- После образования новой клетки каждая ее хромосома содержит одну молекулу ДНК. В S-периоде молекула ДНК удваивается.
- В прометафазе каждая из этих молекул упаковывается в хроматиду, а две «сестринские» хроматиды соединяются друг с другом центромерой, формируя метафазную хромосому.

Хромосомные aberrации

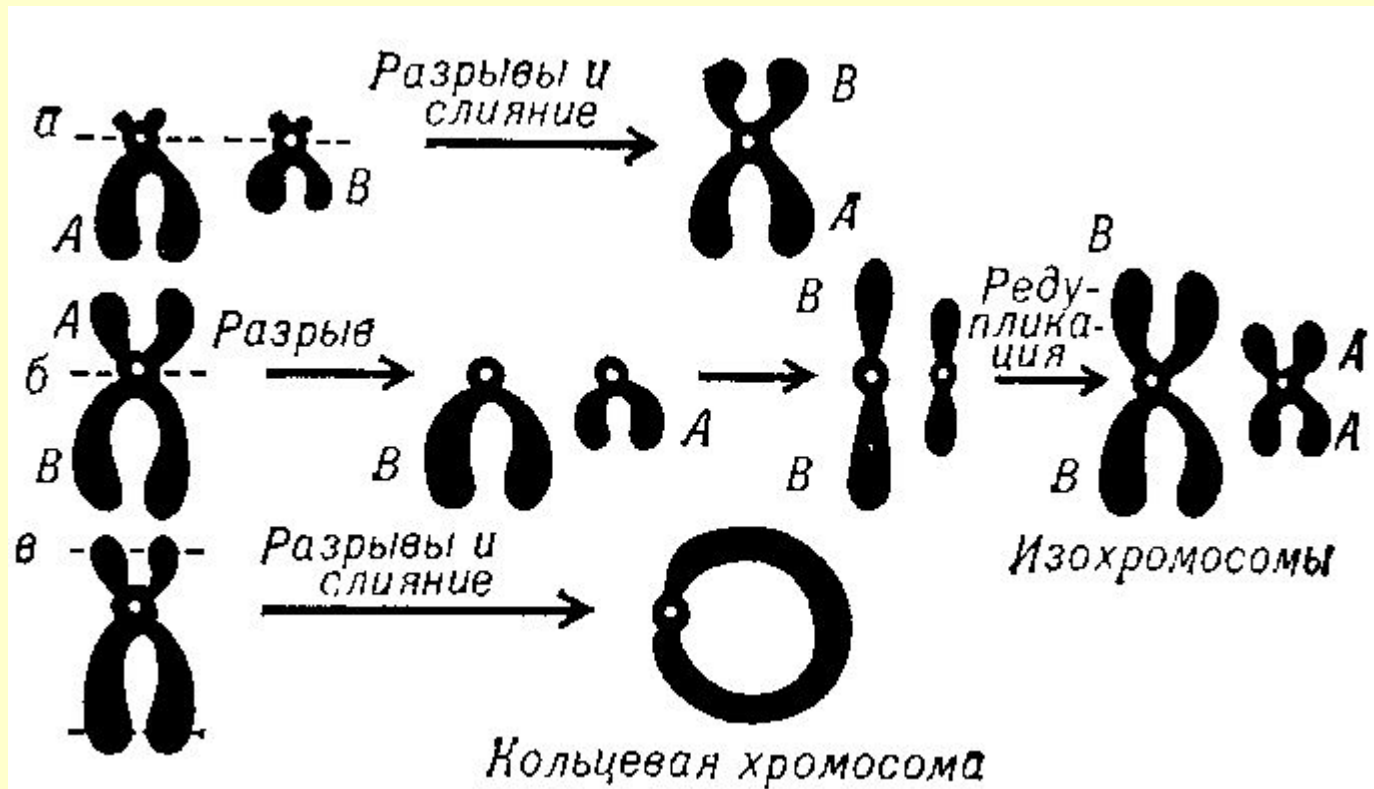
- **Возникающие в клетке aberrации подразделяют на хромосомные и хроматидные.**
- Хромосомные aberrации возникают в случае, когда клетка подверглась облучению в предсинтетической стадии цикла или в S-периоде, но до начала удвоения определенного участка своего генома.
- При неверном воссоединении оторванных друг от друга фрагментов ДНК такое нарушение воспроизводится во время репликации (удвоении).
- Итогом является образование дицентриков — хромосом, имеющих две центромеры, что может сопровождаться появлением ацентрических фрагментов, хорошо видных при сравнении метафазных пластинок облученных и необлученных лимфоцитов. Обмен фрагментами между хромосомами проявляется в виде реципрокных транслокаций .
- Хроматидные aberrации возникают в клетке, облученной уже после завершения репликации всей ДНК или того ее участка, разрыв которого и приведет к формированию aberrации. Разрыв одной из хроматид проявится в виде ее укорочения и образования ацентрического фрагмента, который будет виден при мета- или анафазном анализе.

Хромосомные aberrации

- Разрыв обеих хроматид может проявиться различным образом — образованием двух фрагментов, их слиянием в один (принято говорить о «липкости» концов разорванных хроматид и хромосом, что способствует образованию различных видов перестроек, например, внутрихромосомных обменов) или соединением сестринских хроматид.
- **Аберрации, сопровождающиеся образованием ацентрических фрагментов и дицентриков, получили название нестабильных, так как приводят к гибели самой облученной клетки или ее ближайших потомков из-за невозможности равномерного распределения генетического материала между дочерними клетками.**
- Перестройки, сопровождающиеся только перемещением участков пораженных хромосом, когда весь генетический материал остается связанным с центромерой и может распределяться между дочерними клетками, относят к стабильным перестройкам, так как они могут передаваться в ряду клеточных поколений, сохраняясь в организме в течение многих лет.

Хромосомные aberrации

Схема образования робертсоновской транслокации (а), изохромосом (б) и кольцевой хромосомы (в), А и В — плечи хромосом.



Хромосомные aberrации



- На фото: красным кружком обведены хромосомные аномалии - маркеры радиационного поражения клетки

РЕЗЮМЕ

- Основной молекулярной мишенью действия ионизирующей радиации в клетке является ДНК.
- Двунитевые разрывы ДНК, возникающие вследствие одного акта ионизации, захватывающего обе цепи ДНК, репарируются менее эффективно и с большим количеством ошибок, чем одностранные разрывы.
- Биологический смысл программируемой гибели, которая в определенном смысле является «актом самопожертвования», состоит в недопущении размножения клеток с ошибками в генетическом аппарате.
- Облучение приводит к ряду эффектов, выявляемых на клеточном уровне: замедлению прохождения генерационного цикла, образованию хроматидных и хромосомных аберраций.
- Гибель клеток как по апоптическому, так и некротическому пути происходит как в первой интерфазе после облучения, еще до вступления клетки в митоз, так и в интерфазе между последующими делениями.
- Помимо гибели непосредственно облученной клетки, облучение вызывает гибель части ее потомков в течение нескольких последующих поколений и приводит к генетической нестабильности среди ее потомков.